

Leishmania major に対する細胞性免疫の成立におけるCD40の役割

著者	鎌仲 正人
号	1347
発行年	1997
URL	http://hdl.handle.net/10097/21394

氏 名（本籍）
かま 鎌 なか 仲 まさ 正 ひと 人

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 3 4 7 号

学位授与年月日 平成 9 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科
（博士課程）内科学系専攻

学 位 論 文 題 目 Leishmania major に対する細胞性免疫の成立に
おける CD40 の役割

（主 査）

論文審査委員 教授 佐々木 英 忠 教授 岡 本 宏

教授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

研究目的

B細胞上のCD40と活性化T細胞上のCD40Lの相互作用は効果的な体液性免疫の成立に必須であることが知られている。しかし、CD40-CD40Lが細胞性免疫においてどのような役割を果たしているかは明らかではない。CD40は、抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞にも発現されており、HIMの患者ではクリプトスポリジウム下痢やカリニ肺炎が起りやすことから、細胞性免疫異常が指摘されていた。一方、実験的Leishmania感染は細胞性免疫による生体防御を調べる上で非常に有用なモデルである。Th1反応の成立やマクロファージの活性化におけるCD40の役割を調べるため、Leishmania感染の系を用いて解析を行った。

研究結果

(1) CD40欠損マウスはLeishmania major感染に感受性である。

CD40欠損マウス、野生型リッターメイト、BALB/cマウスの後足の足掌部にL. majorを皮下注射して感染させた。BALB/cと野生型では感染後3-8週で初期の足掌の腫脹が見られ、野生型ではその後自然に治癒し、BALB/cでは逆に病状が進行する。CD40欠損マウスでは初期の腫脹が見られない。しかし、腫脹は遅れて進行性に増大してくる。CD40欠損マウスは、BALB/cマウスと比べて腫脹の弱い感染初期から同等またはそれ以上の虫体が領域リンパ節で検出され、脾臓においても検出が確認された。

(2) CD40欠損マウスではL. major感染に対しTh2優位の反応が起きる。

CD40欠損マウスとBalb/cマウスの領域リンパ節から採取したリンパ球は抗原刺激によって、C57BL/6や野生型マウスよりも有意に高いIL-4産生がみられた。逆に、C57BL/6や野生型マウスでは高いIFN- γ の産生がみられたが、CD40欠損マウスでは非常に低値であった。我々の実験ではBALB/cでも比較的高値のIFN- γ 産生が見られた。以上の結果はCD40欠損マウスはL. major感染に対し、Th2反応を誘導することはできるが、Th1反応を誘導することはできないことを示している。

(3) CD40欠損マウスにおけるIL-12 mRNAの発現

CD40-CD40L相互作用が欠損するとIL-12の産生に影響を与え、そのためにTh1応答が低下している可能性がある。このことを調べるため、領域リンパ節の細胞のIL-12 mRNAの発現量を測定した。IL-12はp35とp40の2つのコンポーネントからなるヘテロダイマーであるがp35は構成的に発現しp40は刺激によって誘導することができる。そこで、p40の発現を競合的逆転

写 PCR 法を用いて定量的に測定した。CD40 欠損マウスのリンパ節細胞では IL-12 p40 の mRNA の発現量は野生型マウスよりも低下しており、BALB/c マウスではその中間の量の発現が認められた。この結果から、CD40-CD40L の欠損は IL-12 の産生に影響を及ぼすことが示唆される。

(4) マクロファージ上の CD40 刺激は Leishmania 殺菌能を誘導する。

C57BL/6 由来のプロテオースペプトンで誘導された腹腔内マクロファージを *in vitro* で *L. major* で感染し、IFN- γ 存在下でリポポリサッカリド (LPS) または抗 CD40 抗体で刺激した。そして、生き残った虫体をトリチウムサイミジンの取り込みで計測した。抗 CD40 抗体も LPS も IFN- γ の存在下で強い leishmania 殺菌能を示した。同様に CD40L を発現する細胞でマクロファージを刺激しても同様に殺菌能を誘導できた。これらの結果は、マクロファージと T 細胞との CD40 を介した物理的接触が leishmania 殺菌能の誘導に必要であることを示唆している。

以上の結果は、CD40-CD40L 相互作用は細胞性免疫の成立における 2 つの段階で重要な役割を果たしていることを示している。すなわち、1. Th1 細胞の精製と 2. マクロファージの活性化である。

研究の意義・独創的な点

CD40-CD40L の役割はこれまで主に体液性免疫の成立について研究がなされていたが、細胞性免疫における役割についてはほとんど知られていなかった。我々は、CD40 ノックアウトマウスを用いた Leishmania 感染系を用いて、CD40 が Leishmania 感染排除に必須であり、その原因として Th1 細胞の分化が起こらないこと、そしてマクロファージの活性化の異常が原因であることを示した。特に、Th1/Th2 の分化の決定機構の解析は多くの免疫疾患の診断、治療に道を開くことが期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

B細胞上のCD40と活性化T細胞上のCD40Lの相互作用は効果的な体液性免疫の成立に必須であることが知られている。このことは、CD40L突然変異をもつX染色体性高IgM症候群(HIM)の患者²⁻⁵⁾やCD40L欠損マウス、CD40欠損マウスにおいて、抗体のクラススイッチや胚中心が形成されないことから明らかである。

CD40は、プロフェッショナル抗原提示細胞であるマクロファージや樹状細胞にも発現されており、これらの細胞のCD40刺激によってサイトカインなどが産生されることが報告されている。in vivoで抗CD40L抗体を投与すると実験的に誘導された自己免疫性疾患や、移植片対宿主病を抑制する。また、HIMの患者ではT細胞の免疫不全症で特徴的に見られる日和見感染症のクリプトスポリジウム下痢やカリニ肺炎が起こりやすい。しかし、これまで、CD40-CD40Lが細胞性免疫においてどのような役割を果たしているかは明らかではない。

in vivoにおける細胞性免疫能の成立にCD40がどのように関わっているかを調べるため、CD40欠損マウスを用いたLeishmania major感染実験を行った。野生型リッターメイトはLeishmaniaに抵抗性であるが、CD40欠損マウスは感受性であることが明らかになった。領域リンパ節中のT細胞をLeishmania抗原とともに培養すると野生型ではIFN- γ が産生されるがIL-4は低値であったが、CD40欠損マウスではIFN- γ の産生が非常に低下しており、IL-4が高値であった。領域リンパ節におけるIL-12 p40mRNAはCD40欠損マウスにおいて野生型、BALB/cマウスよりも低下していた。正常マウスのマクロファージはIFN- γ 存在下でCD40刺激によって活性化され、Leishmania殺菌能が上昇する。以上の結果は、CD40-CD40L相互作用は細胞性免疫の成立における2つの段階で重要な役割を果たしていることを示唆している。すなわち、1. Th1細胞の生成と2. マクロファージの活性化である。

CD40欠損マウスではBALB/cに比べて足掌の腫脹は強くないが、多数のLeishmaniaが脾臓や、リンパ節から検出される。非常によく似た経過をたどる例として、重症免疫不全(scid)マウスにL. majorを感染させた場合がある。このマウスでは、BALB/cよりも遅れて腫脹が増大し、急速に全身性感染を起こす。L. major特異的Th2クローンをscidマウスに移入すると、足掌の腫脹が促進される⁵²⁾。これらのことを考え合わせると、Th2が誘導されるCD40欠損マウスで腫脹の増大が遅れることは興味深い。このことは、CD40-CD40L相互作用を介したTh2によるマクロファージの活性化は、腫脹の増大にサイトカイン産生を誘導することによって関与していることを示しているのかもしれない。

以上のようにCD40-CD40Lは体液性免疫のみならず細胞性免疫における非常に基本的な部分で働いていると考えられる。細胞性免疫の関わる諸疾患の治療や予防を考える上で、このCD40欠損マウスモデルはさらに有用な知見を提供することが期待される。